

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

22 OCT. 2004

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





3 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

INPI DIRECT 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

16 OCT 2003

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0312087

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

16 OCT. 2003

Vos références pour ce dossier

(facultatif) **240905 D21623 NT**

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

NOUVELLES igG3 UTILES POUR STIMULER LA PHAGOCYTOSE.

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ **Personne morale**

☐ **Personne physique**

Nom
ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES
BIOTECHNOLOGIES

GROUPEMENT D'INTERET PUBLIC

1800361471

Zone d'activité de Courtaboeuf 3, avenue des Tropiques 91940 LES
ULIS FRANCE

FRANCE

Française

N° de télécopie (facultatif)

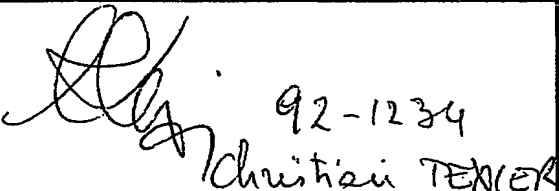

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2^{ème} page

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 16 OCT 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0312087 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 030103
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom _____ Prénom _____ Cabinet ou Société _____ N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel _____ Adresse Rue 20, rue de Chazelles Code postal et ville 75847 PARIS CEDEX 17 Pays _____ N° de téléphone (facultatif) _____ N° de télécopie (facultatif) _____ Adresse électronique (facultatif) info@regimbeau.fr		240905 NT Cabinet REGIMBEAU	
7 INVENTEUR (S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG []	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint <input type="checkbox"/> La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)  92-1234 Christian TEXIER		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

- 5 La présente invention se rapporte à des anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3 produits dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment la lignée YB2/0. Ces anticorps présentent une forte activité en phagocytose et peuvent être administrés pour traiter les cancers et les infections.
- 10 A ce jour, la grande majorité des anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés ou en cours d'essais cliniques appartiennent à la classe des IgG1. Cependant, en dehors des IgG1, d'autres sous-classes d'anticorps pourraient également présenter un intérêt pour le traitement de certaines pathologies.
- 15 Les IgG3 possèdent notamment des capacités effectrices particulières et jouent certainement un rôle important *in vivo*. Bien que ne représentant que 7% des IgG dans les plasma humains, leur proportion est augmentée au cours de certaines réponses immunitaires, par exemple après certaines infections virales (Basic and clinical aspects of IgG subclasses. Volume editor, F. Shakib. Basel; New York : Karger, 1986
- 20 (Monographs in Allergy; Vol 19. Pages 122-133), parasitaires (J Infect Dis. 2003 Mar 1;187(5):862-5, 2003. Immunoglobulin G (IgG) responses to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols are short-lived and predominantly of the IgG3 subclass. Boutlis CS, Fagan PK, Gowda DC, Lagog M, Mgone CS, Bockarie MJ, Anstey NM) ou à la suite d'immunisations contre l'antigène Rh(D) (Iyer YS, Kulkarni SV, Gupte SC. Distribution of IgG subtypes in maternal anti-D sera and their prognostic value in Rh haemolytic disease of the new-born. Acta Haematol. 1992;88(2-3):78-81).
- 25

L'utilisation thérapeutique d'IgG3 reste jusqu'à présent très limitée. Elles sont utilisées en particulier dans le traitement préventif de la maladie hémolytique du nouveau-né,

30 puisque d'une part, les anticorps polyclonaux anti-D actuellement utilisés sont

constitués d'environ 20 à 30% d'IgG3 et d'autre part, des études cliniques utilisant un anticorps monoclonal anti-D IgG3 ont déjà été réalisées avec des résultats encourageants en terme de clairance d'hématies Rh positif et aussi de prévention de l'alloimmunisation (Clin Exp Immunol. 2003 Apr;132(1):81-6. Clearance of red cells by monoclonal IgG3 anti-D in vivo is affected by the VF polymorphism of Fc gamma RIIa (CD16). Kumpel BM, De Haas M, Koene HR, Van De Winkel JG, Goodrick MJ.)

Bien que le mécanisme d'action des anticorps polyclonaux anti-D conduisant à l'absence d'immunisation de la mère, ne soient pas connus, de nombreuses études se sont attachées à démontrer les rôles respectifs des IgG1 et des IgG3 anti-D. Il a par exemple été montré que la formation de rosettes entre les cellules effectrices comme les monocytes, les lymphocytes T CD8, les lymphocytes B et les cellules NK avec des hématies Rhésus D positif, était plus rapide et plus importante avec des IgG3 anti-D en comparaison avec des IgG1. Ces différences peuvent s'expliquer par une région charnière (Hinge) des IgG3 qui est plus longue que celle des IgG1. Cette structure favoriserait la formation de ponts entre les hématies chargées négativement et les cellules effectrices. (Vox Sang. 1989;56(2):101-3. Rate of interaction of IgG1 and IgG3 sensitized red cells with monocytes in the phagocytosis assay, Brojer E, Merry AH, Zupanska B; Immunology. 1992 Jul;76(3):446-51. The functional activity of Fc gamma RII and Fc gamma RIII on subsets of human lymphocytes. Hadley AG, Zupanska B, Kumpel BM, Leader KA).

L'existence d'une compétition entre des IgG1 et des IgG3 suggérant ainsi que ces deux sous-classes d'IgG pourraient reconnaître et activer le même récepteur Fc a été mentionnée dans d'autres études (Immunology. 1989 Apr;66(4):491-8. Distinctive role of IgG1 and IgG3 isotypes in Fc gamma R-mediated functions. Rozsnyay Z, Sarmay G, Walker M, Maslanka K, Valasek Z, Jefferis R, Gergely J).

Au cours d'infection parasitaires comme *P falciparum*, ainsi qu'au cours des infections bactériennes, une réponse de type IgG3 est observée et elle est associée à la production d'IgG1 contre des antigènes protéiques. De même, dans le cas de la réponse anti-polysaccharidique d'origine bactérienne (anti-LPS), même si les IgG2 forment la sous-classe prédominante, il y a une forte réponse de type IgG1 et de façon plus limitée d'IgG3.

Pour les pathologies cancéreuses, il n'y a pas de données sur la production d'IgG3 chez des patients, bien que des traitements anti-tumoraux utilisant des IgG3 couplées à des cytokines aient été utilisés.

La lignée YB2/0 a été sélectionnée depuis plusieurs années pour sa capacité à conférer aux IgG1 produites des propriétés fonctionnelles améliorées. Nous avons montré dans notre demande WO 01/77181 (LFB) l'importance de sélectionner des lignées cellulaires permettant de produire des anticorps présentant une forte activité ADCC du type FcγRIII (CD16). Nous avons trouvé que la modification de la glycosylation du fragment constant des anticorps produits dans des lignées de myélomes de rat telle que YB2/0 conduisait à améliorer l'activité ADCC.

Les structures glycaniques desdits anticorps sont de type biantennées, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation. Plus récemment, nous avons découvert que l'avantage de présenter une forte affinité pour le CD16 peut encore être renforcé par des conditions supplémentaires visant à produire des anticorps qui induisent également la production de cytokines, notamment la production d'IFNγ ou l'IL2. Les deux caractéristiques précitées se complètent. En effet, la production d'IFNγ ou l'IL2 induite par ces anticorps peut renforcer l'activité ADCC. Le mécanisme d'action d'une telle activation tient probablement à une régulation positive autocrine des cellules effectrices. On peut postuler que les anticorps se lient au CD16

provoquant une activité cytotoxique mais également induisent la production de l' IFN γ ou l'IL2 qui au final conduit à augmenter encore davantage l'activité cytotoxique.

5 Dans le cadre de la présente invention, une IgG3 anti-D a été exprimée dans une lignée de myélome de rat afin d'évaluer si cette lignée, notamment YB2/0, peut conférer aux anticorps produits des propriétés fonctionnelles améliorées, comme c'est le cas pour les IgG1.

10 Nos résultats indiquent que les IgG3 ainsi produites présentent une capacité de fixation au CD16 comparable à celle des IgG1. Néanmoins, et dans certaines conditions, cette augmentation de fixation au CD16 n'est pas corrélée à une sécrétion de cytokines et n'induit qu'une faible potentialisation de l'ADCC contrairement à ce qui est observé avec les IgG1. En revanche, nous avons observé de manière tout à fait inattendue que la phagocytose est augmentée.

15

Description

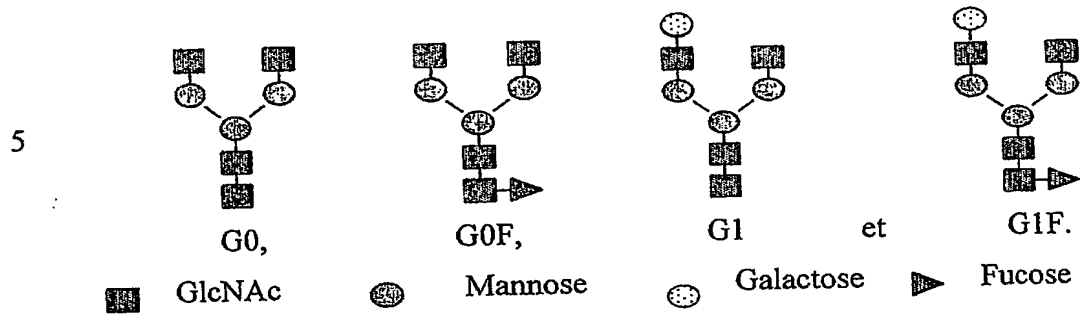
20 Ainsi, dans un premier aspect, l'invention concerne des anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3 caractérisés en ce qu'ils sont produits dans une lignée cellulaire de myélome de rat. De préférence, lesdites IgG3 sont produites dans la lignée YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0.

25 Dans de tels anticorps, la structure glycanique du Fc correspond à un type biantenné, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation.

De plus, le taux de GlcNAc intermédiaire est non nul.

30

De tels anticorps sont plus particulièrement sélectionnés parmi les formes :



- 10 Ainsi, l'invention porte sur des anticorps monoclonaux de classe IgG3 dans lesquels la teneur en fucose est inférieure à 65%, 60%, 50%, 40%, ou 35%. De préférence, la teneur en fucose est comprise entre 20% et 45% ou encore entre 25% et 40%. A titre d'exemple, la teneur en fucose est inférieure à 35%.

L'invention porte également sur des anticorps de classe IgG3 présentant le profil de glycosylation indiqué ci-dessus produits dans des systèmes biologiques équivalents, notamment dans des cellules, plantes ou animaux non humain génétiquement modifiés ou transformés, par exemple par introduction de séquence exprimant une ou plusieurs glycosyl transférase(s) de sorte à obtenir des anticorps présentant un profil essentiellement similaire au profil de glycosylation obtenu chez YB 2/0.

20

Les IgG3 produites dans la lignée YB2/0 présentent des caractéristiques fonctionnelles particulières :

- a) une forte fixation au CD16 qui est comparable à celle des IgG1 produites dans la même lignée cellulaire.
- 25 b) une capacité limitée à induire une activité cytolytique et à certaines concentrations une capacité à induire une inhibition de l'ADCC IgG1 dépendante.
- c) une capacité à induire la sécrétion de cytokines par des cellules effectrices qui est spécifique et différente de celle induite par des IgG1.
- d) une potentialisation de la phagocytose.

30

L'anticorps de classe IgG3 de l'invention peut être sélectionné à titre d'exemple parmi les anticorps dirigés contre : CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11, CD18, CD19, CD20, CD25, CD45 et CD52 comme Campath-1H®, CD33 ou CD38.

- 5 Dans un deuxième aspect, l'invention vise un procédé de production d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3 présentant les caractéristiques fonctionnelles mentionnées ci-dessus comprenant la transfection d'une lignée cellulaire de myélome de rat de préférence, la lignée YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0, avec un ou plusieurs vecteur(s)
- 10 comprenant les séquences codantes pour les chaînes lourdes et légères d'anticorps de classe IgG3, l'expression desdits anticorps dans la lignée cellulaire transfectées, l'extraction et la purification des anticorps.

De préférence, on utilise un système à deux vecteurs d'expression (par exemple des vecteurs dérivés du RSV), l'un codant pour les chaînes lourdes et l'autre codant pour les chaînes légères. Avantageusement, un marqueur de sélection différent est présent dans chaque vecteur. Des constructions spécifiques sont présentées à la figure 1. L'invention porte également sur le système décrit ci-dessus dans lequel les chaînes lourdes et légères sont produites en quantité équimolaire.

- 20 La construction de vecteurs d'expression peut être mise en œuvre selon les procédures connue de l'homme du métier (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Maniatis et al, Cold Spring Harbor).

La co-transfection dans la lignée de myélome de rat des deux vecteurs peut être réalisée au moyen de quantité équimolaire par les procédures standard du type

25 précipitation au phosphate de calcium or par la lipofectine. Ensuite, les lignées transfectées sont sélectionnées dans les milieux de culture adéquats.

Bien entendu, d'autres stratégies, notamment l'utilisation d'un seul vecteur codant pour l'ensemble des chaînes de l'anticorps, peuvent être employées.

Dans un troisième aspect, l'invention concerne des lignées cellulaires de myélome de rat, notamment YB2/0 et des lignées dérivées, transfectées par un ou plusieurs vecteur(s) permettant l'expression d'une IgG3 fonctionnelle. L'invention porte également sur les cellules ayant été transfectées par un ou plusieurs vecteur(s) décrit(s)
5 ci-dessus. Ces cellules sont caractérisées en ce qu'elles produisent des IgG3 présentant le profil de glycosylation mentionné plus haut et au moins l'une des propriétés a) à d) décrites précédemment. Une cellule dérivée d'une lignée décrite plus haut est également objet de l'invention.

10 Dans un quatrième aspect, l'invention porte sur l'utilisation d'IgG3 décrites précédemment, notamment d'IgG3 exprimées dans YB2/0, pour la préparation d'un médicament.

Plus spécifiquement, l'invention vise l'utilisation d'IgG3 décrites précédemment pour
15 la préparation d'un médicament destiné au traitement de différentes pathologies infectieuses d'origines virales ou bactériennes. Les IgG3 de l'invention présentent à cet égard un intérêt en raison de leur forte fixation sur le récepteur Fc de basse affinité (CD16) et de leur forte activité en phagocytose.

20 L'invention a également trait à l'utilisation desdites IgG3 pour le traitement de différentes pathologies cancéreuses, en particulier chez les patients faibles répondeurs au traitement avec des IgG1 exprimées dans CHO, en complément ou non de cette dernière. L'invention porte également sur l'utilisation des IgG3 en association avec une
25 IgG1 exprimée dans une lignée de myélome de rat, notamment YB2/0, dans les pathologies cancéreuses chez les patients diagnostiqués tardivement ou faibles répondeurs au traitement avec l'IgG1 seule.

On entend par "patients faibles répondeurs", des patients ayant un état dit stable, avec moins de 50% de réduction et moins de 25% d'augmentation des lésions. Pas de

nouvelles lésions. Ce groupe de patients comprend également les patients pour lesquels aucune réponse n'est observée (progression de la maladie et mort).

5 Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne l'utilisation d'IgG3 décrites ci-dessus dans les pathologies cancéreuses associées à des infections d'origine virales ou bactériennes, seule ou en association avec une IgG1, pour leur capacité à induire une phagocytose. L'invention couvre également l'utilisation d'IgG3, notamment d'IgG3 exprimées dans YB2/0, en association avec une IgG1 exprimée dans une lignée de myélome de rat, par exemple YB2/0, pour le traitement de pathologies cancéreuses
10 chez les patients ayant un « cytokine release syndrome ». Cette application met à profit la capacité desdites IgG3 à moduler négativement la sécrétion de cytokines. Par exemple, on peut citer l'apparition d'hypothermie, de nécrose rénale aiguë et des maladies du foie due au « cytokine release syndrome » induit par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD3 (Alegre ML et al, J Immunol. 1991 Feb 15;146
15 (4):1184-91).

Plus spécifiquement, l'invention vise l'utilisation d'une IgG3 décrite ci-dessus, qui peut être un anti-CD20, pour prévenir l'apparition du « cytokine-release syndrome » chez les patients traités avec le Rituximab® (IDEC-C2B8) ; Winkler U et al, Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high
20 lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody, Blood. 1999 Oct 1;94 (7):2217-24.

De même, l'IgG3 de l'invention est utile pour prévenir les effets indésirables de l'anticorps CAMPATH®. En effet, l'administration de CAMPATH 1-H, qui se lie au
25 CD52 sur les lymphocytes et monocytes, induit la libération de TNF, d'IFN et d'IL-6 conduisant au « cytokine-release syndrome », Mark G. Wing et al, Mechanism of First-Dose Cytokine-Release Syndrome by CAMPATH 1-H: Involvement of CD16 (FcRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK Cells, J. Clin. Invest, Volume 98, Number
30 12, December 1996, 2819-2826.

Légendes et titres des figures

Figure 1: Schéma des vecteurs d'expression

5 **Figure 2 : Illustration des anticorps produits**

Figure 3 : Interaction des anticorps fixés sur les hématies coatées avec Jurkat CD16

L'axe des x représente la fixation des anticorps sur les hématies et l'axe des y représente la fixation sur le CD16.

10 **Figure 4 : Taux d'IL-2 en fonction de la fixation sur CD16**

Figure 5 : Activité cytolytique ADCC des anticorps anti-D IgG1 et IgG3

Figure 6 : Pourcentage de THP 1 ayant phagocytés une ou plusieurs hématies

Exemple 1 : Obtention de différents anticorps anti-D de classe IgG3.

15

La construction des vecteurs d'expression pour produire deux anticorps recombinants est présentée à la figure 1. Après la construction de ces vecteurs d'expression, des transformants producteurs d'IgG3 D29 ont été obtenus dans les lignées YB2/0 et CHO.

20 Les différents anticorps ainsi produits sont schématisés à la figure 2 :

- Anticorps 1: IgG3 D29 dans la lignée YB2/0
- Anticorps 2: IgG3 exprimée dans la lignée CHO (lignée de référence pour la production industrielle de protéines recombinantes), D29-CHO.
- Anticorps 3: IgG3 (D29, produite par l'hétérohybridome P3x229), D29-P3X229

25

Exemple 2 : Test de fixation des trois anticorps de l'exemple 1 sur Jurkat CD16 (CFC).

30 Ce test a été mis en place pour évaluer la capacité des anticorps anti-D à se fixer sur le récepteur CD16 (Fc gamma RIII) exprimé sur les cellules Jurkat CD16.

La première étape consiste à faire réagir l'anticorps anti-D avec les antigènes Rhésus exprimés à la surface de membranes d'hématies Rhésus positif préalablement coatées sur des plaque de 96 puits (fixation par le Fab). Cette fixation est ensuite détectée par un anticorps anti-IgG humaine marqué à la phosphatase alcaline.

La deuxième étape, à la suite à cette interaction, consiste à ajouter des cellules Jurkat CD16. Après centrifugation leur fixation sur le Fc des anticorps est appréciée (visuellement) et un score est défini (index de fixation).

10

Les résultats sont présentés à la figure 3.

On peut conclure des résultats que l'expression d'une IgG3 dans la lignée cellulaire YB2/0 lui confère une meilleure capacité à se fixer sur les CD16 via son Fc, tandis que la même séquence exprimée dans la lignée CHO ou exprimée par un hétéromyélome (P3X229) se fixe moins bien.

15

Par ailleurs, l'expression d'une IgG3 dans la lignée YB2/0 lui confère une capacité à se fixer sur CD16 qui est comparable à celle d'une IgG1 exprimée dans la même cellule (YB2/0).

20 **Exemple 3 : Test de mesure de l'activation cellulaire (2^{ème} partie du protocole CFc-Jurkat CD16-exemple 2).**

Après l'évaluation de la fixation des anticorps sur Jurkat CD16, les plaques sont ensuite incubées une nuit à 37°C, puis centrifugées. La quantité d'IL2 secrétée par Jurkat CD16 dans les milieux de culture est évaluée par une technique ELISA.

25

Les résultats présentés à la figure 4 montrent que l'interaction des IgG3 avec Jurkat CD16 induit une sécrétion d'IL2 beaucoup plus faible qu'en présence des IgG1.

30

Exemple 4 : Technique de mesure de sécrétion d'IL-2 par Jurkat CD16 après fixation des anticorps sur hématies non coatées.

Différentes dilutions d'anticorps sont incubées en présence d'hématies Rh positif et de cellules Jurkat CD16. Après une nuit d'incubation à 37°C, les cellules sont centrifugées et la quantité d'IL2 secrétée dans les surnageants par Jurkat CD16 est évaluée par une technique ELISA.

Résultats : les IgG3 exprimés dans YB2/0 et CHO induisent très peu de sécrétion d'IL2 par rapport aux IgG1, et cela à concentration d'anticorps identique.

10

Ainsi, contrairement aux IgG1 exprimées dans YB2/0, la fixation sur le CD16 d'une IgG3 exprimée dans YB2/0 induit des taux plus faibles de cytokines (IL2) secrétées par Jurkat CD16, alors que la fixation au CD16 des IgG1 et des IgG3 est comparable.

Exemple 5 : Test de cytotoxicité contre des hématies Rh positif.

Le test de cytolyse quantifie la capacité des anticorps à lyser des hématies Rhésus positif en présence de cellules mononucléées humaines.

Les résultats sont présentés à la Figure 5.

Si l'IgG3 est exprimée dans CHO, l'activité cytolytique est comparable à celle obtenue si l'anticorps est exprimé dans l'hétéromyélome.

En revanche, l'activité cytolytique des IgG3 produites dans YB2/0 est inférieure à celle des IgG1 produites dans YB2/0.

L'expression d'une IgG3 dans YB2/0 potentialise ses capacités à induire une lyse des hématies en présence de cellules mononucléées (PBL) par comparaison au même anticorps produit dans CHO ou par l'hétéromyélome.

Par rapport à l'activité de l'IgG3 produite dans CHO, l'augmentation de l'activité cytolytique de l'IgG3 exprimée dans YB20 est 2,8 fois plus importante et également comparable à celle induite par la fraction polyclonale IgG3 de WinRho.

- 5 En présence d'immunoglobulines polyvalentes (TEGELINE), la lyse des hématies est réduite et ceci d'une façon assez comparable à ce qui observé avec la fraction IgG3 polyclonale du WinRho.
- Enfin, l'expression d'une IgG3 dans YB2/0 bien que potentialisant son activité lytique des hématies en présence de cellules mononucléées, est bien inférieure à celle d'une
- 10 IgG1 exprimée dans la même cellule d'expression (YB2/0).

Exemple 6 : Test cytotoxicité : inhibition de la cytotoxicité induite par les IgG1.

- Des quantités croissantes d'IgG3 exprimées dans YB2/0 sont ajoutées à une
- 15 concentration fixe d'IgG1 R297 (YB2/0). Ce mélange d'anticorps (IgG1+IgG3) est incubé avec des hématies Rhésus positif et des cellules effectrices, soit des cellules mononucléées (PBL) soit des cellules NK purifiées.

Résultats :

- 20 On observe avec l'IgG3 produite dans YB2/0 et dans une moindre mesure avec l'IgG3 produite dans CHO, une diminution de l'ADCC qui est proportionnelle à la quantité ajoutée d'IgG3 produite dans YB2/0.
- L'expression d'une IgG3 dans YB2/0 induit une modulation négative de l'activité cytotoxique des IgG1. Plus la concentration d'IgG3 est importante, moins l'activité
- 25 ADCC induite par les IgG1 est forte.

Exemple 7 : Induction de la sécrétion de cytokines par les anticorps.

La sécrétion de différentes cytokines induite par les IgG3 exprimées dans YB2/0 est comparée à celle induite par les IgG1 exprimées dans YB2/0 et aux IgG3 de même séquence exprimées dans CHO ou par un hétéromyélome.

- 5 Les taux de cytokines (IL6, l'IL8, le TNF alpha, l'IFN gamma, le TGF bêta, l'IP10 et l'IL2) induits par les IgG3 exprimés par YB2/0 sont différents de ceux induits par les IgG1 exprimés dans YB2/0. En particulier, les IgG3 induisent moins d'IFN gamma que les IgG1.

10 **Exemple 8 : Capacité des IgG3 à induire une phagocytose.**

- Test de phagocytose : les cellules de type monocytes/macrophage ou des lignées de type THP-1 sont incubées en présence d'hématies Rhésus positif et d'anticorps. Le nombre de cellules ayant phagocyté au moins une hématie est évalué. Les résultats
15 sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins une hématie (voir figure 6).

- On peut conclure que l'expression d'une IgG3 dans YB2/0 potentialise ses capacités à induire la phagocytose et ceci en comparaison avec une IgG3 exprimée dans CHO ou
20 sécrétée par un hétéromyélome.

Exemple 9 : Etude du profil glycanique des IgG3

- Le profil glycanique particulier de l'IgG3 produite dans YB2/0, c'est à dire, des formes
25 courtes, non sialylées, et avec un taux de fucose inférieur à 35% lui confère des propriétés particulières :

- une forte fixation au CD16 qui est comparable à celle des IgG1,
- une potentialisation de la phagocytose
- une modulation de l'activité ADCC médiée par les IgG1.

REVENDICATIONS

- 5 1. Anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3, caractérisés en ce qu'ils sont produits dans une lignée cellulaire de myélome de rat.
2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisés en ce que la lignée cellulaire de myélome de rat est la lignée YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou
10 modifiée de YB2/0.
3. Anticorps selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisés en ce que la structure glycanique du Fc est de type biantennée, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et
15 une faible fucosylation.
4. Anticorps selon la revendication 3, caractérisés en ce que le taux de GlcNAc intermédiaire est non nul.
- 20 5. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que la structure glycanique du Fc est sélectionnée parmi les formes G0, G0F, G1 et G1F.
6. Anticorps monoclonaux de classe IgG3 selon l'une des revendications 1 à 4, dans lesquels la teneur en fucose est inférieure à 50%, de préférence inférieure à 35%.
25
7. Anticorps selon la revendication 6, caractérisés en ce que le taux de fucose est compris entre 20% et 45%.
8. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 8, présentant les caractéristiques
30 fonctionnelles suivantes :

REVENDICATIONS

- 5 1. Anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3, caractérisés en ce qu'ils sont produits dans une lignée cellulaire de myélome de rat.
2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisés en ce que la lignée cellulaire de myélome de rat est la lignée YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou
10 modifiée de YB2/0.
3. Anticorps selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisés en ce que la structure glycanique du Fc est de type biantennée, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et
15 une faible fucosylation.
4. Anticorps selon la revendication 3, caractérisés en ce que le taux de GlcNAc intermédiaire est non nul.
- 20 5. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que la structure glycanique du Fc est sélectionnée parmi les formes G0, G0F, G1 et G1F.
6. Anticorps monoclonaux de classe IgG3 selon l'une des revendications 1 à 4, dans lesquels la teneur en fucose est inférieure à 50%, de préférence inférieure à 35%.
- 25 7. Anticorps selon la revendication 6, caractérisés en ce que le taux de fucose est compris entre 20% et 45%.
8. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 7, présentant les caractéristiques
30 fonctionnelles suivantes :

- a) une forte fixation au CD16 qui est comparable à celle des IgG1 produites dans la même lignée cellulaire.
 - b) une capacité limitée à induire une activité cytolytique et à certaines concentrations une capacité à induire une inhibition de l'ADCC IgG1 dépendante.
 - 5 c) une capacité à induire la sécrétion de cytokines par des cellules effectrices qui est spécifique et différente de celle induite par des IgG1.
 - d) une potentialisation de la phagocytose.
9. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisés en ce qu'ils sont
- 10 sélectionnés parmi les anticorps dirigés contre CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11, CD18, CD19, CD20, CD25, CD45 et CD52 comme Campath-1H®, CD33 ou CD38.
10. Procédé de production d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou
- 15 humains de classe IgG3 selon l'une des revendication 1 à 9, comprenant la transfection d'une lignée cellulaire de myélome de rat, de préférence la lignée YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0, avec un ou plusieurs vecteur(s) comprenant les séquences codantes pour les chaînes lourdes et légères d'anticorps de classe IgG3, l'expression desdits anticorps dans la lignée cellulaire
- 20 transfectée, l'extraction et la purification des anticorps.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'on utilise un système à deux vecteurs d'expression, l'un codant pour les chaînes lourdes et l'autre codant pour les chaînes légères.
- 25
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce les deux vecteurs comportent un marqueur de sélection différent.
13. Lignées cellulaires de myélome de rat transfectées par un ou plusieurs vecteur(s)
- 30 permettant l'expression d'une IgG3 fonctionnelle.

- a) une forte fixation au CD16 qui est comparable à celle des IgG1 produites dans la même lignée cellulaire.
 - b) une capacité limitée à induire une activité cytolytique et à certaines concentrations une capacité à induire une inhibition de l'ADCC IgG1 dépendante.
 - 5 c) une capacité à induire la sécrétion de cytokines par des cellules effectrices qui est spécifique et différente de celle induite par des IgG1.
 - d) une potentialisation de la phagocytose.
9. Anticorps selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisés en ce qu'ils sont
- 10 sélectionnés parmi les anticorps dirigés contre CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11, CD18, CD19, CD20, CD25, CD45 et CD52 comme Campath-1H®, CD33 ou CD38.
10. Procédé de production d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou
- 15 humains de classe IgG3 selon l'une des revendication 1 à 9, comprenant la transfection d'une lignée cellulaire de myélome de rat, de préférence la lignée YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0, avec un ou plusieurs vecteur(s) comprenant les séquences codantes pour les chaînes lourdes et légères d'anticorps de classe IgG3, l'expression desdits anticorps dans la lignée cellulaire
- 20 transfectée, l'extraction et la purification des anticorps.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'on utilise un système à deux vecteurs d'expression, l'un codant pour les chaînes lourdes et l'autre codant pour les chaînes légères.
- 25
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce les deux vecteurs comportent un marqueur de sélection différent.
13. Lignées cellulaires de myélome de rat transfectées par un ou plusieurs vecteur(s)
- 30 permettant l'expression d'une IgG3 fonctionnelle.

14. Lignées cellulaires selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il s'agit de la lignée YB2/0 ou ses dérivées.
- 5 15. Cellule dérivée d'une lignée selon l'une des revendications 13 et 14.
16. Utilisation d'une IgG3 selon l'une des revendications 1 à 9, notamment d'IgG3 exprimées dans YB2/0, pour la préparation d'un médicament.
- 10 17. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de différentes pathologies infectieuses d'origines virales ou bactériennes.
- 15 18. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de différentes pathologies cancéreuses, en particulier chez les patients faibles répondeurs au traitement avec des IgG1 exprimées dans CHO, en complément ou non de cette dernière.
- 20 19. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament destiné à être utilisé en combinaison avec une IgG1 exprimée dans une lignée de myélome de rat, notamment YB2/0, pour le traitement des pathologies cancéreuses chez les patients diagnostiqués tardivement ou faibles répondeurs au traitement avec l'IgG1 seule.
- 25 20. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies cancéreuses associées à des infections d'origine virales ou bactériennes, seule ou en association avec une IgG1, pour leur capacité à induire une phagocytose.

14. Lignées cellulaires selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il s'agit de la lignée YB2/0 ou ses dérivées.
- 5 15. Cellule dérivée d'une lignée selon l'une des revendications 13 et 14.
16. Utilisation d'une IgG3 selon l'une des revendications 1 à 9, notamment d'une IgG3 exprimée dans YB2/0, pour la préparation d'un médicament.
- 10 17. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de différentes pathologies infectieuses d'origines virales ou bactériennes.
- 15 18. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de différentes pathologies cancéreuses, en particulier chez les patients faibles répondeurs au traitement avec une IgG1 exprimée dans CHO, en complément ou non de cette dernière.
- 20 19. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament destiné à être utilisé en combinaison avec une IgG1 exprimée dans une lignée de myélome de rat, notamment YB2/0, pour le traitement des pathologies cancéreuses chez les patients diagnostiqués tardivement ou faibles répondeurs au traitement avec l'IgG1 seule.
- 25 20. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies cancéreuses associées à des infections d'origine virales ou bactériennes, seule ou en association avec une IgG1, pour sa capacité à induire une phagocytose.

21. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament pour le traitement des pathologies cancéreuses chez les patients ayant un « cytokine release syndrome ».
- 5 22. Utilisation selon la revendication 21 pour moduler négativement la sécrétion de cytokines.

21. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'un médicament pour le traitement des pathologies cancéreuses chez les patients ayant un « cytokine release syndrome ».
- 5 22. Utilisation selon la revendication 21 pour moduler négativement la sécrétion de cytokines.

1 / 5

Vecteurs d'expression

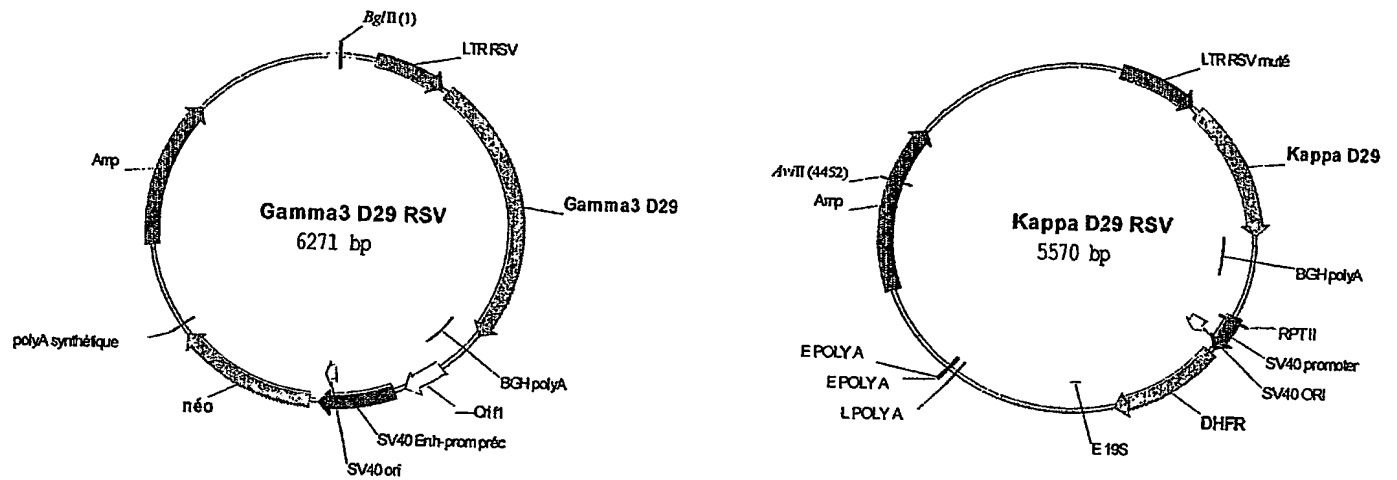


FIGURE 1

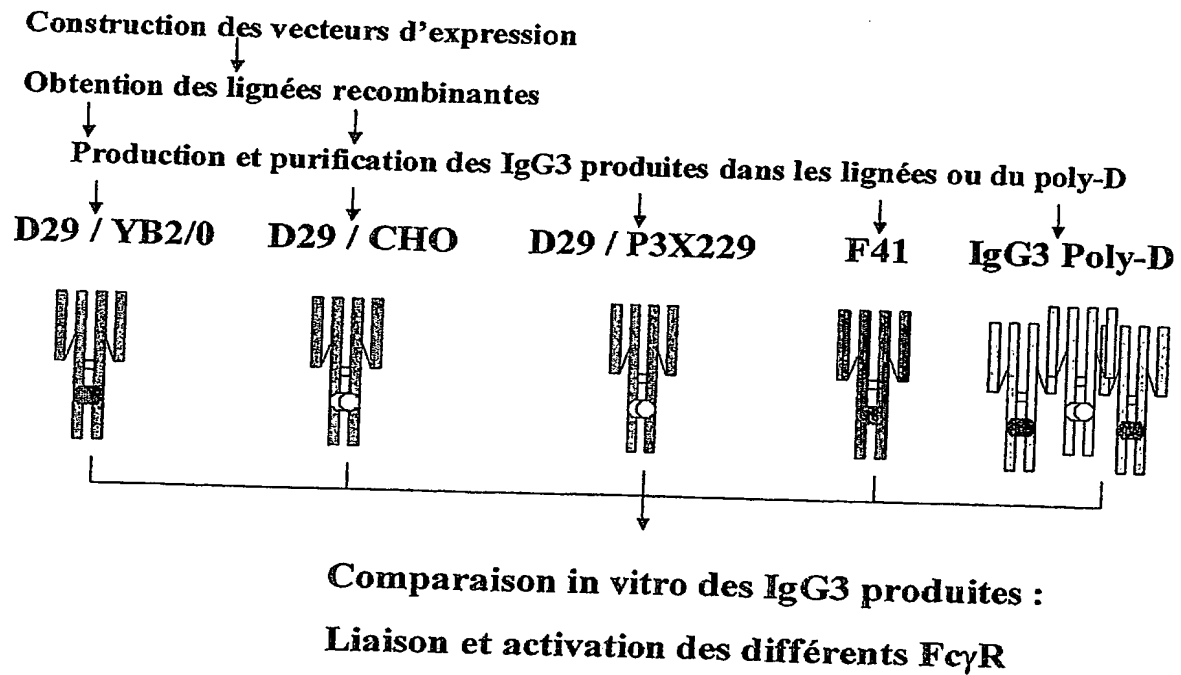


FIGURE 2

Interaction des anticorps fixés sur les hématies coâtées avec Jurkat CD16
 Test CFC 371 03 038

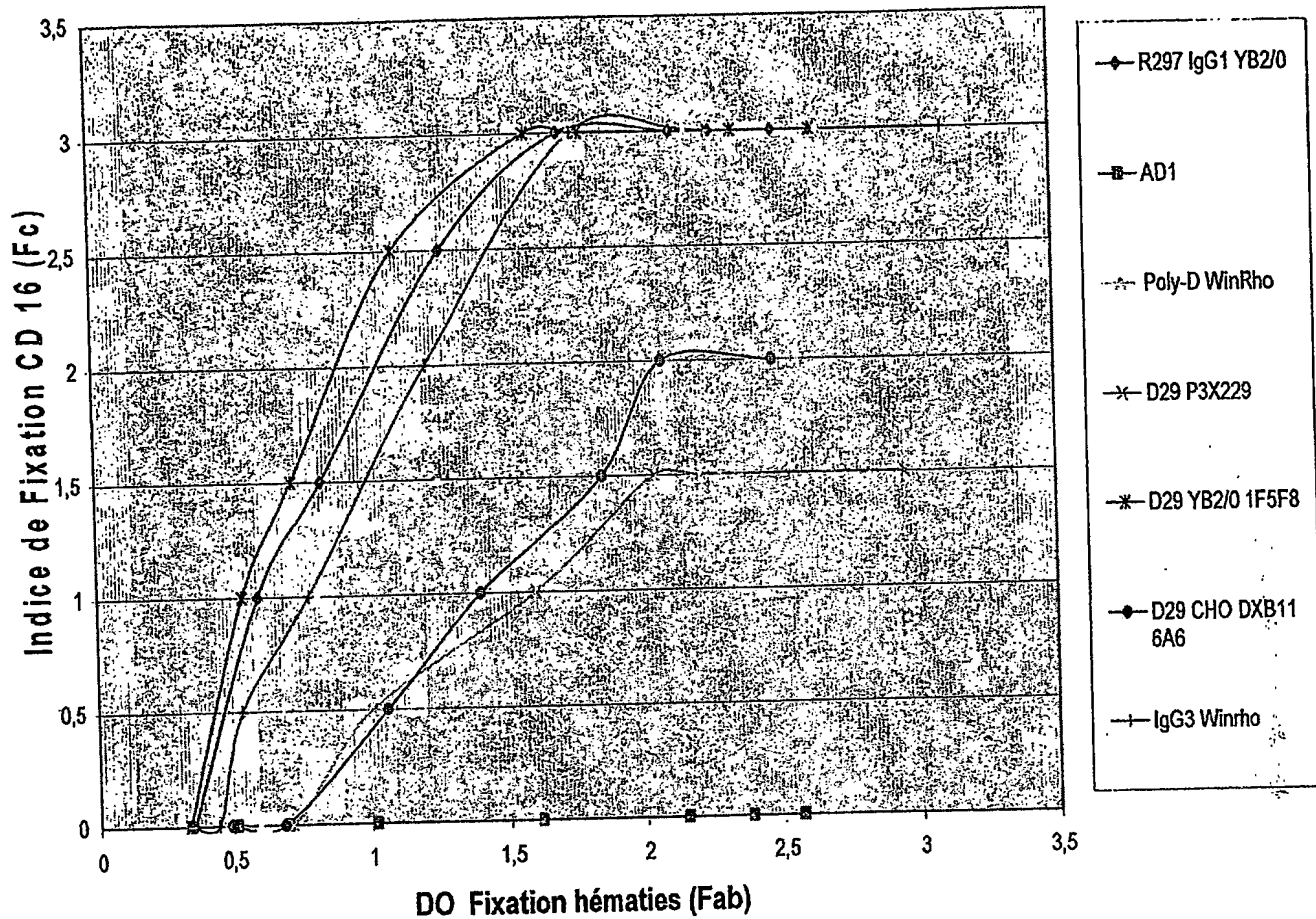


FIGURE 3

Taux d'IL2 en fonction de la fixation sur CD16

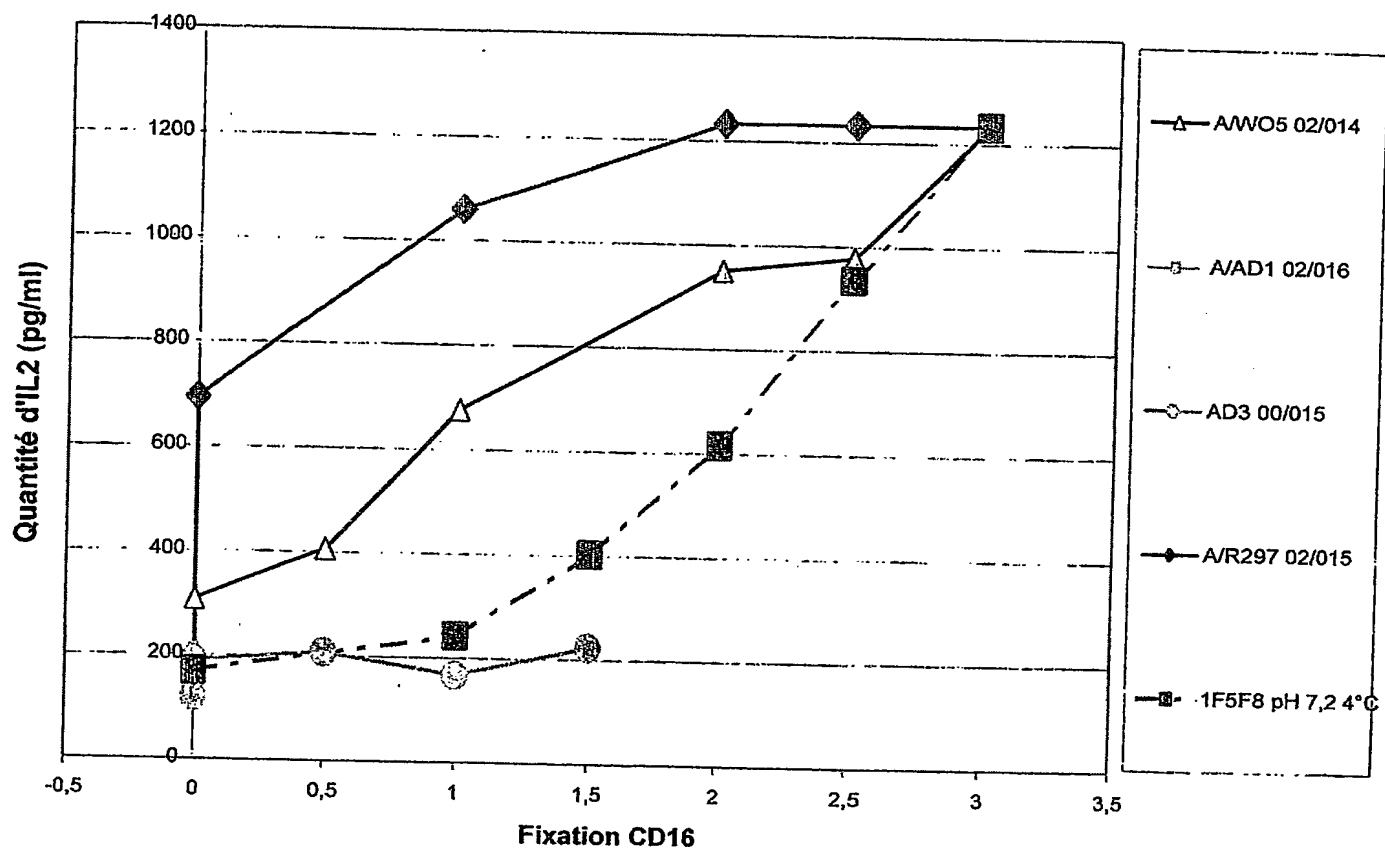


FIGURE 4

Activité cytolytique des anticorps anti-D IgG1 et IgG3
ADCC 375 03 028

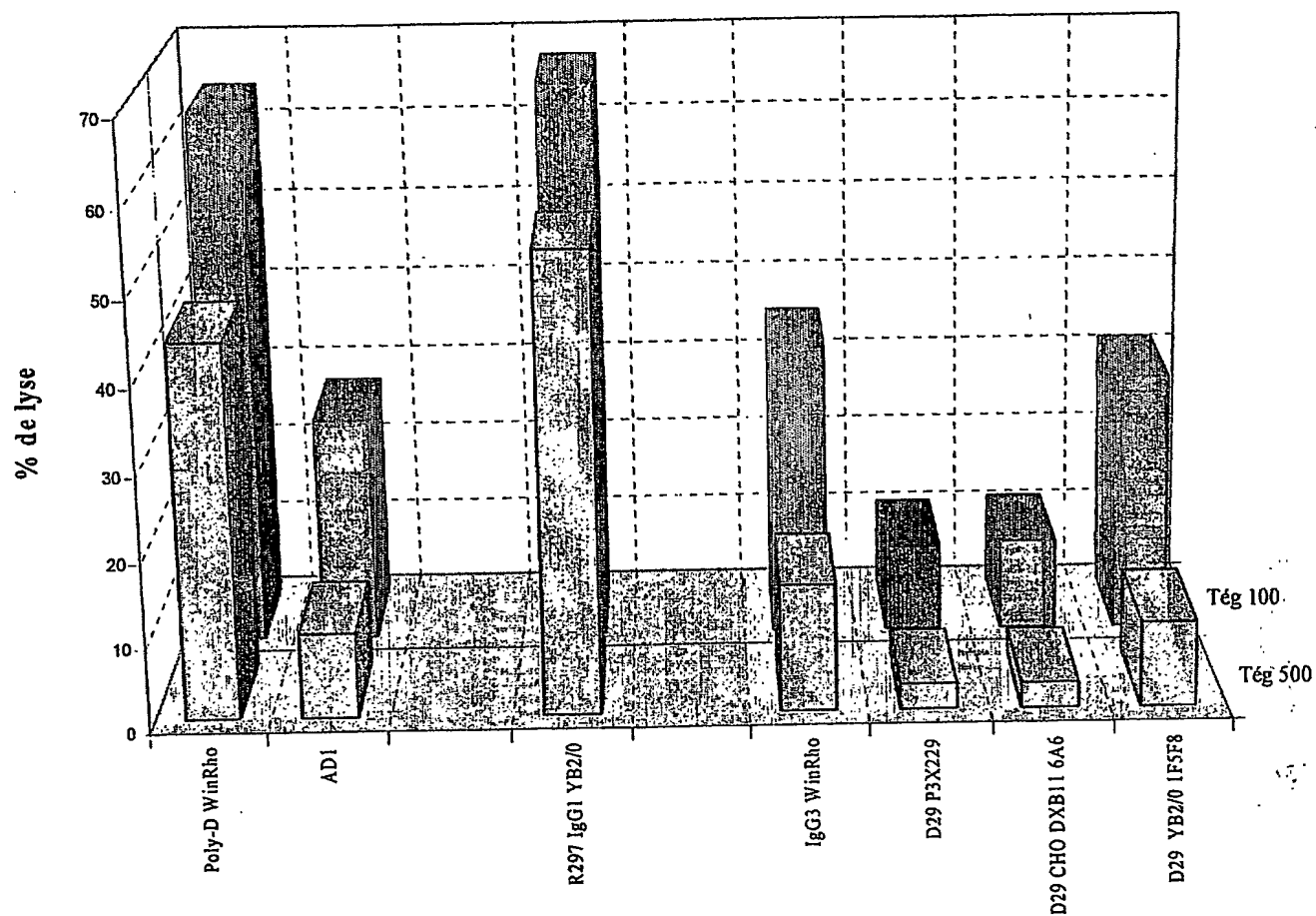


FIGURE 5

5 / 5

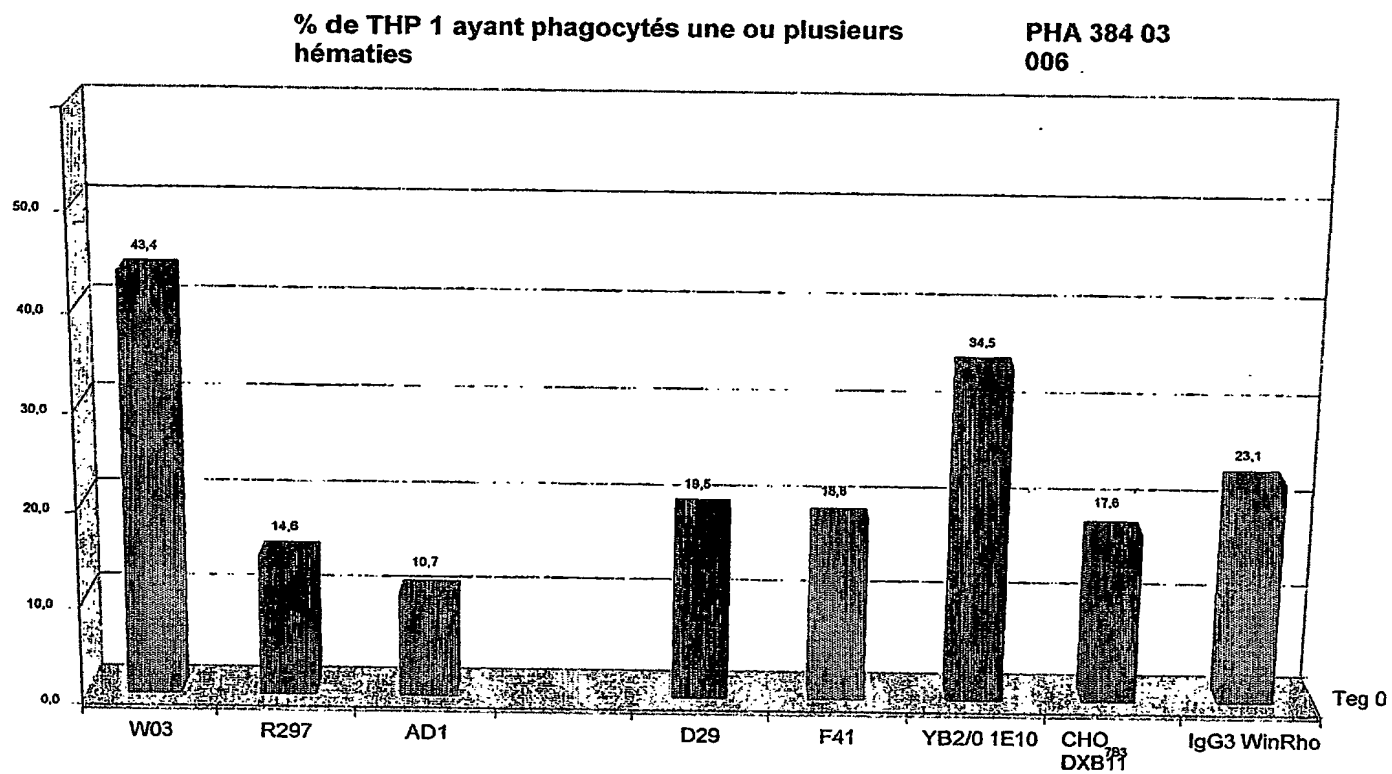


FIGURE 6

DÉPARTEMENT DES BREVETS

15, rue de Saint Pétersbourg

75010 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .../...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Numéros de références pour ce dossier (facultatif)	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	240905 D21623 NT
N° DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	0312087

NOUVELLES IgG3 UTILES POUR STIMULER LA PHAGOCYTOSE.

DEMANDEUR(S) :

LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES : Zone

d'activité de Courtaboeuf

3, avenue des Tropiques

91940 LES ULIS - FRANCE

INVENTEUR(S) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom		
Prénoms		de ROMEUF Christophe
Adresse	Rue	116, rue de la Bassée
	Code postal et ville	59000 LILLE / FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		
Prénoms		JORIEUX Sylvie
Adresse	Rue	17 rue Molière
	Code postal et ville	59650 VILLENEUVE D'ASCQ / FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		BOUREL Dominique
Adresse	Rue	35, avenue Germaine
	Code postal et ville	59110 LA MADELEINE / FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

J. WARCLOIN

03 02 2004

[Signature]
MNS

reçue le 03/02/04



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 2/2 ...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240905 D21623 NT
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0312087
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
NOUVELLES igG3 UTILES POUR STIMULER LA PHAGOCYTOSE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES Zone d'activité de Courtaboeuf		
3, avenue des Tropiques		
91940 LES ULIS - FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		KLEIN PHILIPPE
Prénoms		
Adresse	Rue	6 rue Corbet
	Code postal et ville	59000 LILLE / FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		BIHOREAU Nicolas
Prénoms		
Adresse	Rue	36 avenue Parrat
	Code postal et ville	91400 ORSAY / FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
J. WARRCOT 03/02/2004 411259		



PCT/FR2004/002657

